



DEUTSCHES
PATENTAMT

21 Aktenzeichen: P 44 00 955.0
22 Anmeldetag: 14. 1. 94
43 Offenlegungstag: 29. 6. 95

DE 44 00 955 A 1

30 Innere Priorität: 32 33 31
23.12.93 DE 43 44 351.6

71 Anmelder:
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., 80636 München, DE

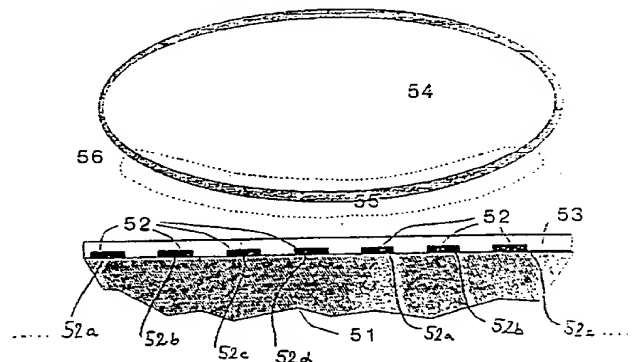
74 Vertreter:
Leonhard, R., Dipl.-Ing.; Olgemöller, L., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Fricke, J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anwälte, 80331 München

72 Erfinder:
Voigt, Andreas, 13051 Berlin, DE; Müller, Torsten,
12439 Berlin, DE; Hagedorn, Rolf, 13057 Berlin, DE;
Fuhr, Günter, 13127 Berlin, DE; Wagner, Bernd, 14199
Berlin, DE; Lisec, Thomas, 10319 Berlin, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Adhäsionssteuerbare ultraminaturisierte Oberflächenstruktur

57 Zur Vermeidung oder selektiven Erhöhung von Teilchenadsorptionen bzw. -adhäsionen auf flexiblen oder starren Materialien werden extrem miniaturisierte (im Submikrometerbereich) planare Elektrodenstreifen (22; 42, 44; 52) auf eine Oberfläche (21; 41; 51) aufgebracht, die mit hochfrequenten Impulsfolgen so beaufschlagbar sind, daß wandernde oder stehende elektrische Oberflächenwellen entstehen, wobei die Elektroden selbst mittels dielektrischer, oder in ihrer Biokompatibilität geprüfter Isolier-Materialien (23; 43, 45; 53) kombiniert werden und damit partiell oder vollständig bedeckt sind. Die Art der elektrischen Ansteuerung bestimmt in Kombination mit den Eigenschaften der die Elektroden bedeckenden Oberflächenschichten die Adhäsionseigenschaften der Oberfläche weitgehend unabhängig vom verwendeten Basismaterial. Die Teilchen werden schonend in ihrer Bewegung beeinflusst. Erstmals wird es möglich, Teilchen in hochphysiologischen Nährlösungen zu beeinflussen.



DE 44 00 955 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 05.95 508 026/539

10/30

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine leitfähige Oberflächenstruktur, um suspendierte mikroskopische Partikel und Zellen zu beeinflussen. Sie betrifft auch die Verwendung dieser Struktur zur Steuerung der Adhäsionseigenschaften der Partikel und Zellen.

In der Medizintechnik, der Biokompatibilitätsforschung, insbesondere bei der Herstellung transplantierbarer Materialien, aber auch in der biologisch-pharmakologischen Forschung wird seit langem nach Oberflächen gesucht, die einerseits abstoßend auf in physiologischen und technischen Lösungen befindliche Partikeln und Zellen wirken, andererseits in bestimmten Fällen die Adhäsion fördern (BOGRAND, p. (ed.), *Physiol Basis of Cell-Cell-Adhesion*, ORC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1988. CURTIS, A.S.G., PITTS, J.D. (eds.), *Cell Adhesion and Motility*, Cambridge University Press, Cambridge, 1980. GRINELL, F., *Int. Rev. Cytol*, 53: 65—144, 1978. LEE, L.H., *Recent Advances in Adhesion*, Gordon & Breach, London, 1973. OTTEWILL, R.H., ROCHESTER, C.H., SMITH, A.L. (eds.), *Adsorption from Solution*, Academic Press, London. PERELSON, A.S., DELISI, Ch., WIEGEL, F.W., *Cell Surface Dynamics, Concepts and Models*, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel, 1984). In der Regel wird diese "Oberflächenmodifizierung" über Hydrophilisierung oder Hydrophobisierung, über die Ankopplung geladener molekularer Gruppen oder durch lokale Ankopplung hochspezifischer Bindungsstellen (z. B. Antikörper) erreicht. Nachteilig an diesen Oberflächenmodifizierungen ist die geringe Reichweite in die Partikelsuspension (in der Regel wenige Å), die sehr unterschiedliche Langzeitstabilität, sowie die nicht vorhandene Steuerbarkeit der Effekte.

Daß elektrische Felder über Elektroden in eine Partikel- oder Zellsuspension ausgekoppelt werden können und über Polarisierung der Teilchen Moleküle und Zellen zu den Elektroden hin- oder wegdrücken können, wurde ausführlich von POHL 1978 (POHL, H.P., *Dielectrophoresis*, Cambridge Press, Cambridge 1978) untersucht und in Patenten, wie US 43 90 403, fixiert.

Diese als Dielektrophorese bezeichneten Kräfte können sowohl anziehend (positive Dielektrophorese) als auch abstoßend (negative Dielektrophorese) wirken. Das Phänomen wird sowohl zur Sammlung von Schmutzpartikeln in makroskopischen Filtern als auch zur Sammlung und Separation von Zellen und Mikropartikeln in Mikrostrukturen genutzt, allerdings bisher aus folgenden Gründen nur begrenzt nutzbar:

(i) Elektroden wurden im makroskopischen Bereich verwendet und, bis zu einigen Mikrometern miniaturisiert, auch auf planaren Oberflächen erzeugt. Die in die Flüssigkeit entkoppelten elektrischen Hochfrequenzfelder durchdringen dann mit nahezu gleicher Feldstärke die gesamte Zelle, woraus eine hohe Belastung der Objekte (Zellen und Partikel) resultiert und sehr hohe Anregungsspannungen erforderlich sind (einige V bis zu einigen 100 V).

(ii) Die Elektroden sind immer noch so groß, daß sich Zellen auf ihnen ablagern können, obwohl das Feld angeschaltet ist, da sie auf der breiteren Elektrode keine Nachbarelektroden mehr spüren, wodurch der angestrebte Effekt zunichte gemacht wird. Dieses Problem entsteht z. B. in der WO 91/11 262 (P & B Sciences Limited), wo zwar ein Elektrodenarray benutzt wird, das kammerförmig (vgl. die dortige Fig. 1B) sein kann, nicht aber

dessen Größe und Abmessung an die zu beeinflussenden Partikel anpaßt. Diese WO befaßt sich vielmehr ausschweifend mit den Größen und Formen von "non-uniform-Magnetfeldern" und deren Einfluß auf chemische Reaktionen zwischen den Zellen.

(iii) Mit den Elektroden in Kontakt gekommene oder direkt von ihnen angezogene Zellen oder Partikel verändern sich auf Grund der Metall-Zelloberflächenreaktion irreversibel.

Hochfrequente Wanderwellen, erzeugt über elektrische Signale, wurden von MELCHER zum Pumpen von Ölen genutzt (MELCHER, J.R., *The physics of fluids*, 9: 1548—1555, 1966). Ende der 80er, Anfang der 90er Jahre konnte dieses Prinzip auch in Mikrokanälen mittels halbleitertechnologisch gefertigter Elektrodenstrukturen umgesetzt werden. Das Prinzip beruhte auf der Stabilisierung eines Temperaturgradienten und der Erzeugung phasenverschobener Raumladungen. Auch hier lag die Elektrodenbreite bei einigen 10 µm (FUHR, G. et al, MEMS 92, Proceedings, 1992).

Daß auch Partikel und Zellen mittels wandernder elektrischer Felder selektiv bewegt werden können, wurde von MASUDA (MASUDA, S., IEEE-Transaction on Industry Applications, 24, 217—222, 1988) gezeigt und 1991 auf hochfrequente Wanderwellen ausgedehnt (FUHR, G. et al, MEMS 91, Proceedings, 259—264, 1991). Ziel dieser planaren Anordnung war die Bewegung einzelner Zellen in Mikrokanalsystemen mit dem Ziel der Zellseparation, wie sie in WO 91/3850 (Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.) näher erläutert ist.

Gegenüber diesem Stand der Technik liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine Oberfläche in ihrem Adhäsionsverhalten insbesondere für suspendierte Zellen und Makromoleküle elektrisch steuerbar zu verändern.

Das wird mit der technischen Lehre des Anspruches 1 erreicht. Die abhängigen Ansprüche konkretisieren und erweitern den abstrakten — vom Anspruch 1 in seinen tragenden Merkmalen umrissenen — Gedanken der elektrisch steuerbaren Adhäsionswirkung einer dielektrisch abgedeckten Subminiatur-Elektroden-Streifenfläche.

Die erfindungsgemäßen Verwendungen der erwähnten Struktur sind von den Ansprüchen 20 bis 22 erfaßt.

Mittels einer im Subminiaturbereich (unterhalb von 10 µm) strukturierten planaren Oberfläche können die mikroskopischen und submikroskopischen Partikel oder Zellen (im folgenden: "Teilchen") elektrisch gesteuert an der Isolierschicht angelagert oder abgestoßen werden, ohne sie hohen Belastungen auszusetzen, ohne sie chemisch zu verändern und ohne mit dauerhaften nicht ablösbaren Ablagerungen konfrontiert zu werden.

Mit den Elektrodenystemen der Erfindung kann mit physiologischen (leitfähigen) und sogar mit hochleitfähigen Lösungen gearbeitet werden. Dieser Umstand erweitert die medizinisch-biologische Anwendung elektrischer Feldtechniken erheblich, und zwar um einen Anwendungsbereich, der bisher für nicht funktionsfähig erachtet wurde.

Der Erfindung liegt dabei die Erkenntnis zugrunde, extrem schmale Elektrodenbänder in sich wiederholender Folge auf eine Oberfläche aufzubringen, die so schmal sind, daß im günstigsten Falle mehrere Elektrodenbahnen dem typischen Durchmesser der Teilchen entsprechen.

Unter Subminiaturbereich versteht die Erfindung einen Bereich, der bei etwa 10 μm beginnt und nach unten unbegrenzt ist; allerdings derzeit durch zur Verfügung stehende Fertigungstechniken auf Bereiche um 500 nm beschränkt blieb. Gleichwohl haben Experimente gezeigt, daß die patentgemäßen Wirkungen umso deutlicher zu Tage treten, als die Abmessungen weiter verringert werden. Besonders relevant ist demnach der Bereich unter 1 μm .

Ein direkter Kontakt der Partikel mit den Elektroden wird durch eine aufgelagerte, insbesondere biokompatible (Anspruch 17), dielektrische Schicht verhindert, deren Materialeigenschaften so gewählt werden, daß ein elektrisches Feld mit einer noch ausreichenden Feldstärke in den oberflächennahen Flüssigkeitsraum ausgekoppelt werden kann. Da die Feldstärke mit dem reziproken Abstand der Elektroden und proportional zur angelegten Spannungsdifferenz zunimmt, ergibt sich erst im gewählten Submikrometerbereich (Anspruch 17) die Möglichkeit mit geringen Amplituden (100 mV bis 1 V) die erforderlichen Feldstärkegradienten auf einer Seite der Partikeln und Zellen zu erzeugen.

Die in die Flüssigkeit eingekoppelten Feldstärkegradienten werden mit schmalen verändernden Elektroden auch schneller mit dem Abstand von der Oberfläche abfallen, da sich die Anteile im oberflächenfernen Flüssigkeitsbereich überlagern und kompensieren. Dieser Umstand vermindert die elektrische und thermische Belastung der Partikeln außerordentlich.

Erfindungsgemäß läßt sich dieser Effekt über die Applizierung wandernder elektrischer Oberflächenwellen, vornehmlich im Hochfrequenzbereich (kHz — MHz) verstärken, so daß unter den oben geschilderten Randbedingungen eine elektrische Steuerung der Adhäsionseigenschaften der Oberfläche erfolgen kann und die Teilchen erst dann in den elektrischen Einflußbereich der Oberfläche gelangen, wenn sie der Oberfläche sehr nahe kommen.

Die aufgebrachten erfindungsgemäßen Schichten koppeln einerseits das wandernde elektrische Feld in geeigneter Weise in den oberflächennahen Flüssigkeitsraum aus und verhindern andererseits elektrolytische Prozesse, so daß sie in physiologischen Lösungen hoher Leitfähigkeit eingesetzt werden können (Anspruch 20).

Die Isolier-Schichten (Merkmalsgruppe b des Anspruches 1) sind solche Schichten, die die wäßrige oder leitfähige Lösung mit den darin suspendierten Teilchen von den Elektroden trennt, demnach "isoliert". Diese Isolierung ist sowohl mechanisch gemeint, sie ist ebenso elektrisch gemeint, es kann auch eine Kombination der beiden vorerwähnten Isoliermöglichkeiten sein. Günstig ist ein hoher Dielektrizitäts-Koeffizient, zwingend erforderlich ist er allerdings nicht.

Bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung werden nachfolgend unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher erläutert.

Fig. 1 und Fig. 3 sind jeweils perspektivische Ansichten der mikrostrukturierten Oberfläche mit elektrisch leitenden Elektrodenstreifen 22, 42, 44 und aufgelagerten Isolier-Schichten 23, 45, 43.

Fig. 2 und Fig. 4 sind Schnittbilder der in Fig. 1 und Fig. 3 dargestellten Strukturen.

Fig. 5 dient der Erläuterung der Kraftwirkung auf ein zelluläres Objekt 54.

Fig. 6 veranschaulicht in zwei Bildern die zellschonende Wirkung von Oberflächenstrukturen im 1 μm -Bereich.

Fig. 7a und Fig. 7b sind Darstellungen, wie mit poten-

tialmäßig gesteuerten Elektroden Säure und Base (auch Anode und Kathode) erzeugbar sind um dem pH-Gradienten von Fig. 7b im μm -Bereich zu stabilisieren.

Fig. 1 und Fig. 2 zeigen eine in ihrem Adhäsionsverhalten (bezüglich Teilchen in Suspension) elektrisch steuerbare planare Oberfläche mit einer Elektrodenstreifenfläche 11. Die Elektroden 22 sind über 4 Zuleitungen 12, 13, 14 und 15 zu Gruppen von jeweils 4 Elektroden zusammengefaßt und periodisch in dieser Gruppenkonfiguration (a, b, c, d...) ansteuerbar. In gleicher Weise können Gruppen aus jeweils 3 oder auch mehr Elektroden gebildet werden. Auf diese Weise ist es möglich, in ihrer Richtung festlegbare elektrische Wanderwellen zu erzeugen.

Im angegebenen Beispiel wird dies erreicht, indem vier um jeweils ein Viertel in der Phase verschobene periodische Signale an die Zuleitungen 12, 13, 14 und 15 angelegt werden, so daß sich über der Elektrodenstreifenfläche 11 ein mit einer vorgebbaren Geschwindigkeit ausbildendes Wanderfeld erzeugt wird, das die Teilchen in der Suspension schonend bewegt.

Die den Elektroden aufgelagerte Isolier-Schicht 23 koppelt die wandernden Felder dielektrisch in die darüber befindliche Flüssigkeit 24 aus und kann biokompatibel sein.

Die Oberflächenwellen werden umso kräftiger ausgekoppelt, je höher die relative Dielektrizitätskonstante und je dünner die Isolier-Schicht 23 gewählt werden. Typische Dicken für die beschriebenen Anwendungen sind einige 10 nm bis zu einigen Mikrometern ("Sub-Mikrometerbereich"). Die aufgelagerte Schicht kann jedoch auch durch mono-, bi- und multimolekulare Schichten ersetzt oder ergänzt werden. Mit diesen Schichten können die zellspezifischen biokompatiblen Eigenschaften wesentlich unterstützt werden. Als Materialien kommen beispielsweise Polyuretan, Teflon, Metall- und Halbleiteroxide oder -isolatoren (SiO_2 , SiC , Si_3N_4) in Frage. Die molekularen Schichten können Lipide, Detergentien, Polymere oder ähnliches sein.

Über diese Isolier-Schichten können die Oberflächen zusätzlich lateral in ihren Adhäsionseigenschaften strukturiert und prädestiniert werden.

Die Steuerung der Adhäsionseigenschaften erfolgt über das Anlegen der hochfrequenten Signale mit Frequenz, gegenseitigem Phasenbezug und Amplitude. Im Beispiel wandern die elektrischen Oberflächenwellen jeweils in eine Richtung. Durch veränderte Beschaltung der Elektroden über die Zuführungen 12, 13, 14 und 15 können gegenläufige, stehende und alternierende Wellen erzielt werden. Die so gesteuerte Einheit kann auf feste oder flexible Substrate 21 (mit der Oberfläche 16) makroskopisch flächenbedeckend aufgebracht werden.

Diese Strukturen können auch in aufgerollter Form die Wände von Schläuchen oder anderen Reaktionsräumen (treatment cells) bilden.

Die beschriebenen Strukturen werden mit bekannten Herstellungstechniken der Halbleitertechnologie, z. B. in Elektronenstrahl-Lithographie und bekannten Abscheide- und Ätzverfahren erzeugt.

Fig. 3 und Fig. 4 zeigen eine Oberflächenstruktur bei der zwei zueinander dielektrisch isolierte Elektrodenstreifenflächen 42, 44 um 90° gedreht angeordnet sind. Die gesamten Elektrodenstreifen sind mit Isolier-Deckschichten 31, 32, 45 passiviert, über die die wandernden Oberflächenwellen beider Elektrodenebenen in die Flüssigkeit ausgekoppelt werden können. Je nach Anwendungszweck können die Einzelelektroden entweder in Gruppen zusammengefaßt und miteinander ver-

die über jeweils mindestens drei Elektroden (22a, 22b, 22c) erzeugten wandernden elektrischen Oberflächenwellen unterschiedliche Wandergeschwindigkeiten dadurch besitzen, daß die Elektroden (22; 42, 44; 52) der Gruppen mit in der Frequenz verschiedenen periodischen Signalen angesteuert werden.

4. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Wandergeschwindigkeit der elektrischen Oberflächenwellen sich periodisch ändert und/oder stehende Wellen erzeugt werden.

5. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die den Elektroden aufgelagerten Isolier-Schichten (23; 43, 45; 53) verlustbehaftete Dielektrika sind, die die Elektroden zumindest teilweise bedecken.

6. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die den Elektroden aufgelagerten Isolier-Schichten aus mehreren Lagen bestehen und/oder mikrostrukturiert sind.

7. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Elektrodenstreifen ein anderes dielektrisches Material streifen- oder domänenartig angeordnet ist.

8. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden streifenförmig angeordnet sind und im Vergleich zur Elektrodenbreite makroskopische Flächen bedecken.

9. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß, zueinander isoliert (43), mehrere solche Elektrodenareale (42, 44) übereinander angeordnet sind.

10. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrodenstreifen senkrecht zur Oberfläche gewellt oder gefaltet sind.

11. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberflächenstrukturen mit Halbleitertechnologischen Methoden auf Substraten (21, 41, 51), wie Silizium, Glas, Plastik, Keramik oder flexiblem Folien-Material, strukturiert ist.

12. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß durch Aussteuerung einzelner Elektroden (22a, 22b, 22c, 22d; 42a, 42b ...; 44a, 44b ...; 52a, 52b ...) oder Elektrodengruppen in lokal begrenzten Bereichen Adhäsionsmuster mit einem Auflösungsraaster der doppelten Elektrodenbreite erzeugt werden.

13. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens teilweise Rohre, Test- oder Reaktionsräume, Schläuche, Kanäle, sensoroberflächen, Implantatoberflächen und Lagergefäße auskleiden.

14. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einer der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Kanäle oder Poren oder sonstige Verbindungen, die die angrenzenden Volumenphasen hydrodynamisch, osmotisch oder elektrisch zueinander in Kontakt bringen, in regelmäßiger oder

unregelmäßiger Anordnung durchbrochen ist.

15. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einer der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden durch elektronische Bauelemente, wie Transistoren oder Dioden, partiell oder vollständig ersetzt oder angesteuert sind.

16. Adhäsionssteuerbare Oberflächenstruktur nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch, Signale im Voltbereich (0.5 V bis 1.5 V).

17. Oberflächenstruktur nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolier-Schicht (23; 43, 45; 53)

(a) eine Dicke (d) im Sub-Mikrometerbereich (von molekularer Dicke bis μm -Dicke) aufweist; und/oder

(b) biokompatibel ist.

18. Oberflächenstruktur nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die dielektrische Schicht (23; 43, 45) aus einem in der Halbleitertechnik verwendeten Werkstoff gebildet wird, insbesondere aus SiO_2 , SiC , Si_3N_4 , Bariumtitanat, Tantaloxyd oder einem Abdecklack.

19. Oberflächenstruktur nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Subminiaturbereich sich von etwa $10\ \mu\text{m}$ abwärts erstreckt.

20. Verwendung einer Oberflächenstruktur nach einem der vorhergehenden Ansprüche für/in eine(r) physiologische(n) Lösung hoher Leitfähigkeit, insbesondere Nährlösung.

21. Verwendung einer Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 19 als Biosensor hoher Lebensdauer.

22. Verwendung einer Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 19 als Biosensor zur Stabilisierung von pH-Gradienten in wäßrigen oder leitfähigen Lösungen.

23. Oberflächenstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolier-Schicht (23; 43, 45)

(a) eine mechanische Trennschicht, eine elektrische Isolierschicht oder eine Kombination davon ist; und/oder

(b) eine dielektrische Schicht mit insbesondere hohem Dielektrizitäts-Koeffizienten ist.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig.5 *

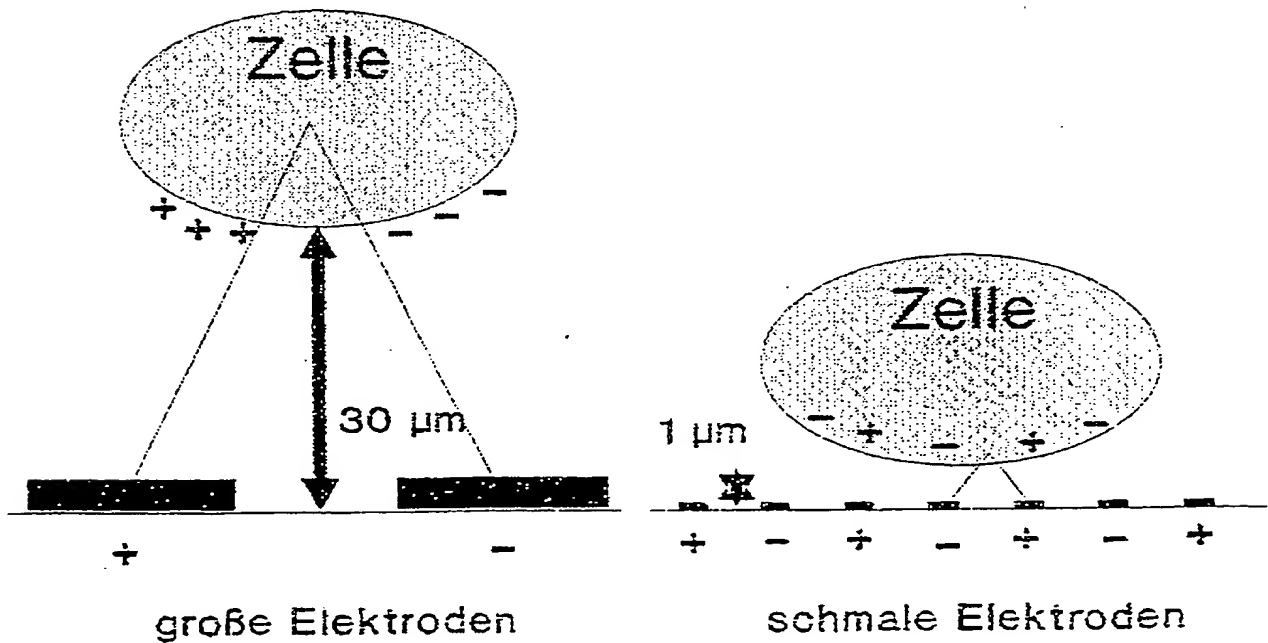
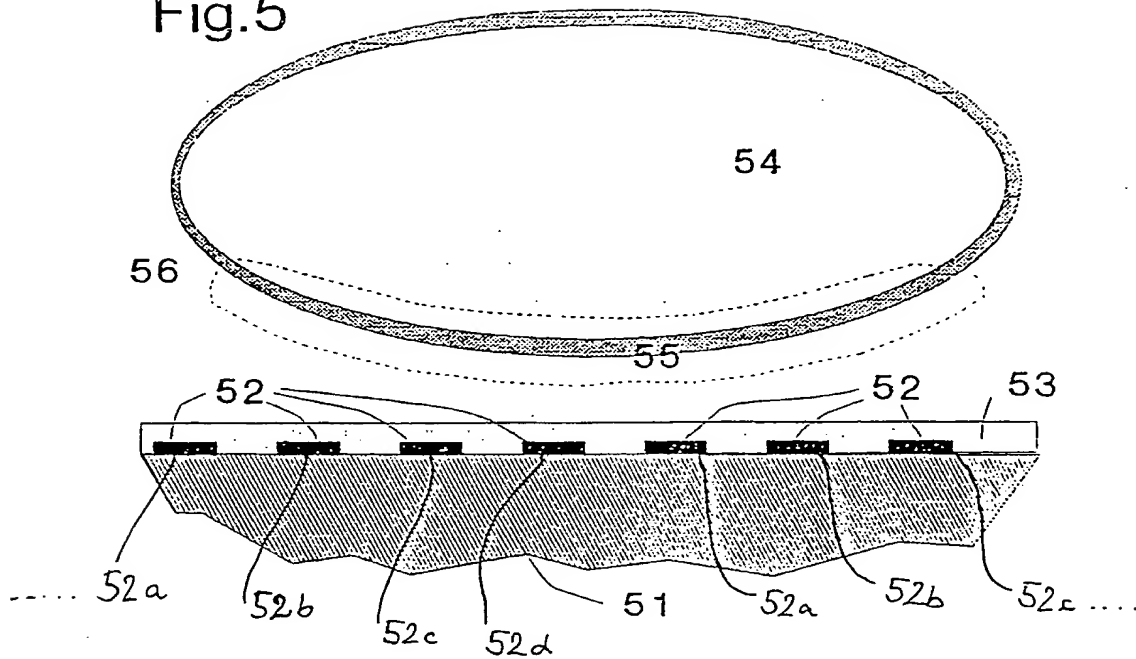


Fig.6

Fig.1

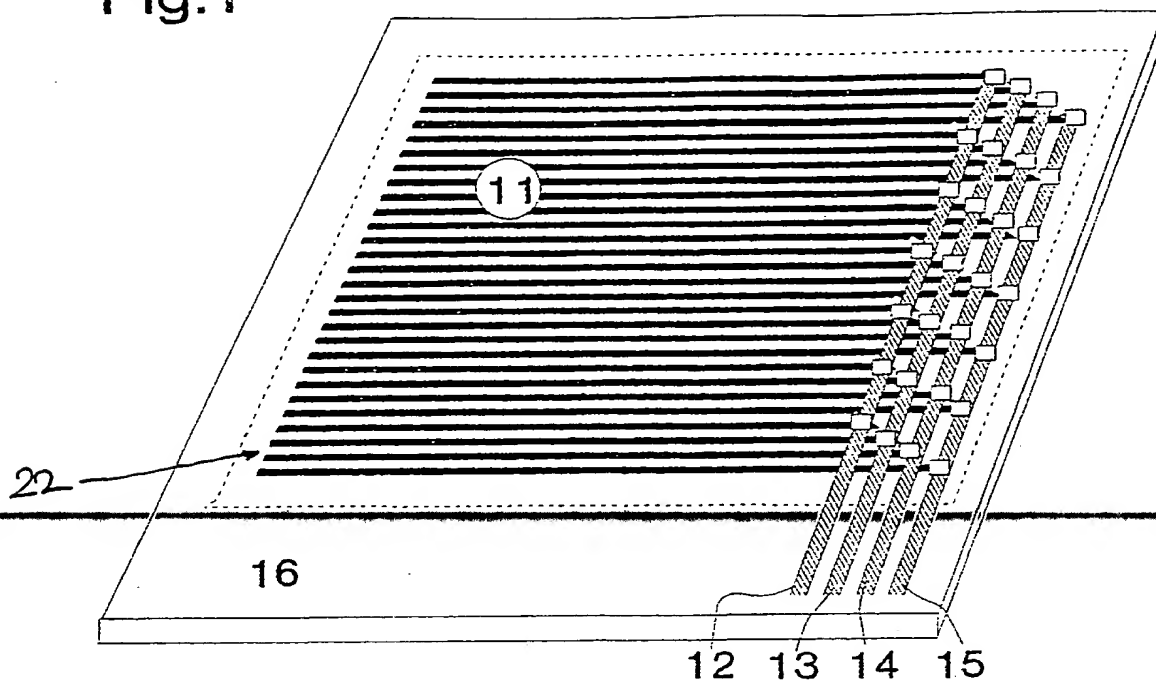


Fig.2

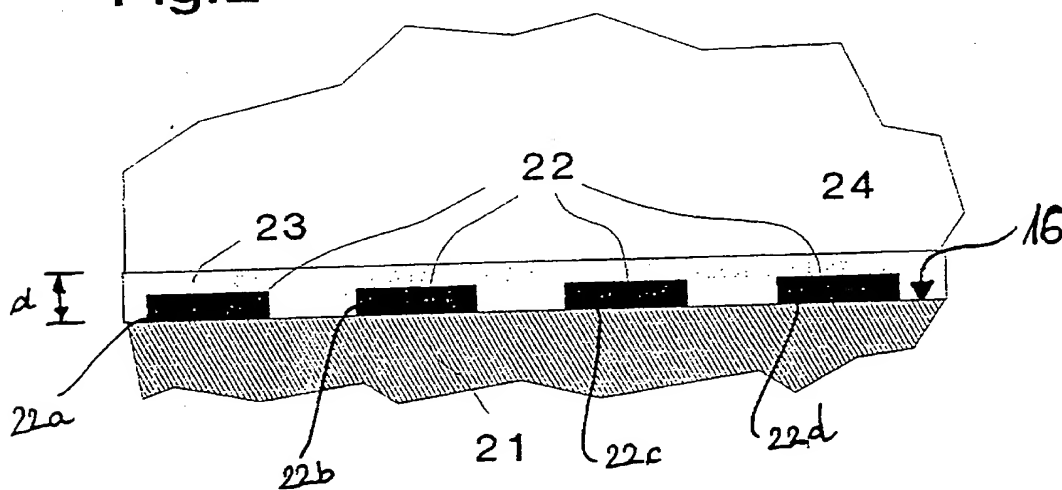


Fig.3

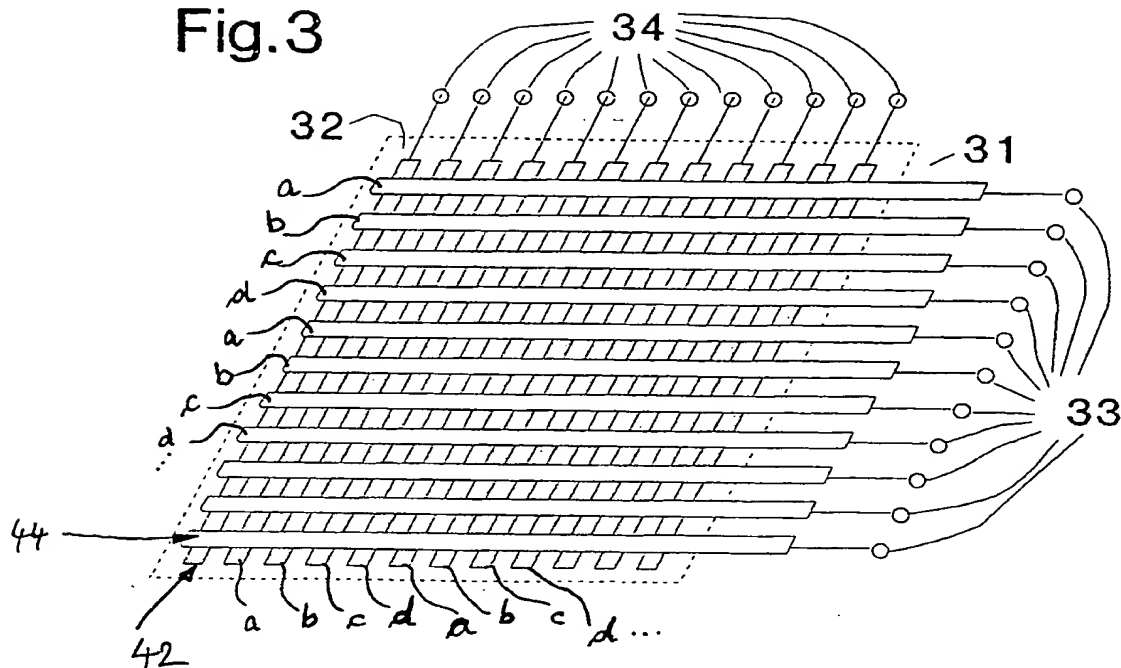
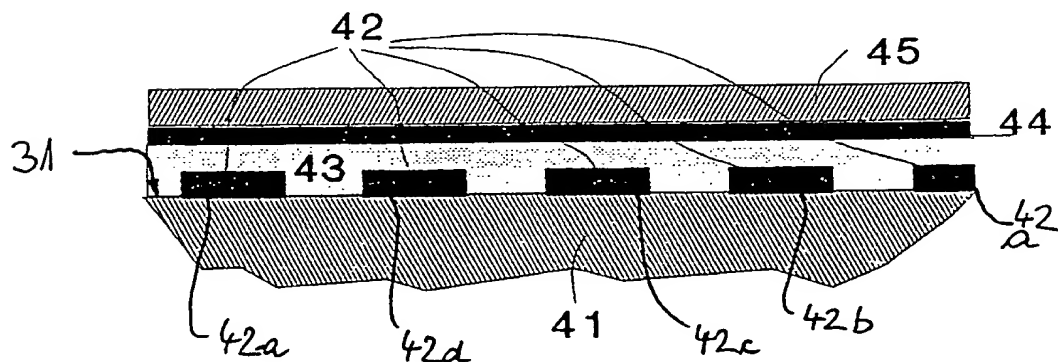


Fig.4



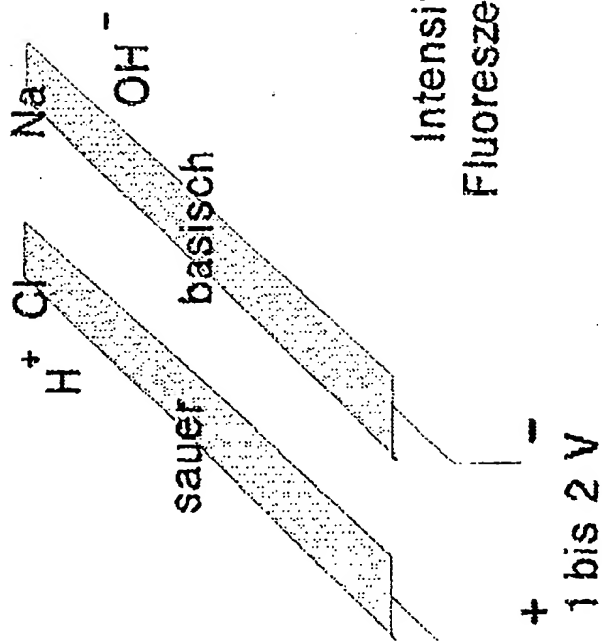


Fig. 7a

Fig. 7b

